

# Biographical sketch

Nicoletta Fucà was born in Noto, Italy, on April 08, 1981. She received her high school education at the Scientific Liceo in Avola, Siracusa. In 2006 Nicoletta Fucà graduated with a bachelor and a master degrees in Food Science and Technology, majoring in Nutrition Biochemistry.

In January 2007, Ms. Fucà started her present work as Ph.D student, under the supervision of Professor Giuseppe Licitra, by Consorzio Ricerca Filiera Lattiero-Casearia. Since CoRFiLaC collaborates with scientific partners of great international relevance, Ms. Fucà was visiting researcher at the Nutrition and Food Science Department by the Utah State University (Utah-USA) from August 2007 to July 2008. There, she had the great opportunity to work on dairy products microstructure with the supervision of Professor Donald J. McMahon and the research manager William McManus.

Since the beginning of her Ph.D. program, she specialized on studying microstructure by Confocal Laser Scanning Microscope.

# Acknowledgments

I desire to thank and express my gratitude for all of the people who, in different ways, have been close to me giving encouragement and making possible both my studies and the drafting and completion of this dissertation.

I feel deeply to thank Margherita Caccamo, for contributing to my growth in the professional field. In a special way, I am grateful to her for having been directed me to the study of microstructure and image analysis and for her example of the principles of ‘Quality’ as a very real ‘style’ of approaching any activity. The teaching and encouragement she offered helped me to believe in myself and follow my dreams. For her continuous availability and promptness in suggestions and clarifications, I will never forget her patience throughout my experience, her advices and, at the same time, her appreciation for what I achieved.

A special acknowledgment goes to Stefania Carpino for her help in finding new challenges and new goals to reach and to have given me the chance to confront my ideas with hers. Thanks for her support during my American experience, for having guided me with her precious suggestions during this formative experience and for the critical readings of this dissertation.

As my tutor, Professor Giuseppe Licitra has provided unfailing guidance for my PhD’s research. With his apparent severe behaviour, I admire not only his academic pursuit, but also his special personality and his brilliant, deep thoughts. I feel lucky to have him as my tutor. Thanks for having given me the opportunity to live part of my PhD in the USA, experience that let me grow personally and professionally.

I would like to thank all of the people with whom I interacted during my PhD, those with whom I exchanged thoughts, new ideas, or simply a laugh within the laboratories. In different ways they all contributed to my formative experience, helping me to believe in myself, awakening within me new interests and above all helping me discover, directly or indirectly, the way to pursue them.

Laura Tuminello of the laboratory of microstructure in *CoRFiLaC* for her contribution in researching on microstructure, but first of all for her friendship.

Gaetano Impoco, who taught me how to look at and process a digital image and worked with me in many experiments. Thanks to have helped me to elaborate data.

Vita Maria Marino who shared with me her love for science.

Thanks to William McManus, who passed on me his knowledge about microscopy, resolved most of my doubts and allowed me to work with confocal microscope.

Donald J. McMahon for having welcomed and led me in the unique and unrepeatable research experience in USA, for his teachings in research and for letting me work in Logan lovable. Thanks to his family, that made my stay nice and easier.

Last, but not least, I want to thank my family who stood beside me, not just supporting me, but most of all, putting up with me.

My first thought is of my parents, to whom I dedicate this dissertation: without their help I would have never reached this goal. I'm so very grateful for all of their help and their love, spoken or unspoken, that came from their heart: to all those times they encouraged me when I was buried in books and this dissertation, but most of all for their trust in me and my abilities.

My lovable sisters, Anna and Giovanna, who are also my best friends and believe in my will power and my perseverance, always available to help me.

David, who with extreme patience encouraged me when, under stress, I didn't believe I could make it. This goal has been reached with his continuing presence, his taking care of me, without asking anything in return.

December 09/12/2009

Nicoletta

*Ai miei genitori*

## ***Contents***

LIST OF FIGURES.....	ix
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xiii
LIST OF TABLE.....	xv
SINTESI.....	xvi
Microstruttura e microscopia confocale a scansione laser.....	xvi
Organizzazione della tesi.....	xviii

### **Part I: GENERAL OVERVIEW..... xxi**

#### ***Chapter 1***

##### **MICROSCOPY**

Introduction.....	1
1.1 Optical microscopy.....	1
1.2 Fluorescence microscope.....	2
1.3 Confocal Laser Scanning Microscope (CLSM).....	3
1.4 CLSM techniques.....	6
Conclusions.....	9

## ***Chapter 2***

### **FLUORESCENCE**

Introduction.....	10
2.1 Basic Concepts of Fluorescence .....	11
2.2 Fluorophores.....	15
2.3 Immunolabelling.....	20
2.4 Green Fluorescent Protein.....	21
Conclusions.....	23

## ***Chapter 3***

### **MICROSTRUCTURE**

Introduction.....	24
3.1 Microstructural features and their interactions.....	25
3.2 Dairy products microstructure.....	27
3.3 Manipulating food microstructure.....	32
3.4 Influence of microstructure on rheology.....	34
3.5 Influence of microstructure on flavours.....	35
Conclusions.....	38

## ***Chapter 4***

### **COMPUTER VISION AND IMAGE PROCESSING**

Introduction.....	41
4.1 Image Analysis process.....	41
4.2 Image pre-processing.....	42
4.3 Noise removal.....	42

4.4 Image segmentation.....	43
4.4.1 Edge detection.....	44
4.4.2 Thresholding-based segmentation .....	45
4.4.3 Region-based segmentation .....	48
4.4.4 Segmentation using morphological watersheds .....	48
4.5 Measurement of object characteristics.....	49
Conclusions.....	50

## **Part II: CLSM applications**

Summary.....	51
--------------	----

### ***Chapter 5***

#### **APPLICATIONS TO CHEESE STRUCTURE**

5.1 Three dimensional reconstruction of Pecorino cheese micrographs: fat globules evaluation.....	53
5.2 Imaging of Ragusano and Pecorino cheeses for structure characterization.....	62
5.3 Automatic labelling of CLSM images.....	70

### ***Chapter 6***

#### **APPLICATION TO MILK**

6.1 Heating treatments effects on milk and its products.....	74
--	----

### ***Chapter 7***

#### **APPLICATION TO WOODEN TOOLS**

7.1 Bacteria biofilm in inactive Tina wooden vats.....	80
--	----

Conclusions and perspectives.....	87
-----------------------------------	----

## ***Appendix***

### **CORFILAC AND ITS FACILITIES**

Introduction.....	90
I The microscopy laboratory.....	91
II <i>NIKON D-Eclipse C1si</i> .....	92
<i>III.II.I Significant reduction in image acquisition time.....</i>	<i>93</i>
<i>III.II.II True spectral imaging.....</i>	<i>94</i>
<i>III.II.III Spectral imaging focusing on brightness.....</i>	<i>95</i>
<i>III.II.IV Unmixing of images with no crosstalk.....</i>	<i>95</i>
<i>III.II.V CFI Plan Apochromat .....</i>	<i>96</i>
Conclusions.....	97
 Bibliography.....	 98



## *List of Figures*

Figure 1.1. Main component in a Confocal Laser Scanning Microscopy.

Figure 2.1. Jablonski Diagram illustrates the electronic states of a molecule and the transitions between them.

Figure 2.2. Photobleaching rates in a multiply stained specimen.

Figure 2.3. Typical fluorochrome absorption-emission spectral profile.

Figure 2.4. Absorption and emission wavelengths of some fluorophores, lasers emission wavelength and main filters.

Figure 2.5. Skeletal formula of fluorescein isothiocyanate.

Figure 2.6. Alexa Fluor are available in a wide range of fluorescence excitation and emission wavelengths.

Figure 2.7. Comparison of the relative fluorescence of Alexa Fluor® 488 dye and FITC.

Figure 2.8. Photobleaching profiles of cells stained with Alexa Fluor® 488 or fluorescein.

Figure 2.9. Structural formula of Nile Red.

Figure 2.10. Structural formula of Methylene Blue.

Figure 2.11. Direct (A) and indirect (B) methods of immunolabeling.

Figure 2.12. GFP structure. One wholly-reproduced protein (on the left) and cutaway version to show the fluorophore (on the right).

Figure 3.1. Schematic picture of micelle formation.

Figure 3.2. Partial coalescence. Protruding crystals pierce the closest globules, especially when lipids rolls around each other.

Figure 3.3. Schematic diagram of casein micelle with casein-calcium phosphate aggregates. (A) Complete supramolecule, and (B) Portion of the supramolecule periphery.

Figure 3.4. Micellization of amphiphilic molecules promoted by hydrophobic forces.

Figure 3.5. Relation between free energy ( $\Delta G$ ) of formation of hydrophobic bonds and temperature.

Figure 4.1. Ideal representations of models of a step, ramp and roof edge detection and their corresponding intensity profiles.

Figure 4.2. Thresholding-based segmentation.

Figure 5.1. Two dimensional slices of Pecorino cheese. **A)** Fat distribution. **B)** Proteins distribution.

Figure 5.2. Volumes obtained using various rendering modes. **A)** The same intensity value was given to proteins and lipids. **B)** Lipids were emphasized, giving a lower intensity value to the proteins. **C)** Feature extraction. Identification of lipids was performed, based upon their morphology. **D)** Feature extraction. Lipids were discriminated upon their size. Larger fat drops were labelled in red whereas fat droplets were coded in blue.

Figure 5.3. Identification of fat globules. Lipids were coded using different colors depending on their volume size.

Figure 5.4. Visualization of Pecorino cheese 3D microstructure while rotating.

Figure 5.5. **A)** and **B)** Volume viewing and detection of a region of interest (ROI). **C)** Cropping image in the space. The images was resized down to the ROI, making the handling faster, and the viewing of the ROI easier. **D)** Detail of a ROI.

Figure 5.6. Percentages of large fat globules and small fat droplets.

Figure 5.7. Confocal micrographs of Ragusano Cheese. **A)** Protein matrix stained with FITC. **B)** Fat globules treated with Nile Red. **C).** Merged image of protein and fat phases.

Figure 5.8. Confocal micrographs of Pecorino cheese. **A)** Protein matrix stained with FITC. **B)** Fat globules treated with Nile Red. **C)** Merged image of protein and fat phases.

Figure 5.9 Histogram of circularity for Ragusano and Pecorino cheese.

Figure 5.10. Multiscale statistics.

Figure 5.11. Automatic classification of features based on pixel neighbourhoods and the PDFs generated during the learning stage.

Figure 6.1. A1, “Provola” at 1 day of brine made from raw milk (Pr). B1, “Provola” at 1 day of brine made from pasteurized milk (Pt).

Figure 6.2. A) Raw milk. B) Pasteurized milk at 73 °C for 13, 75sec. C) Heated milk at 73 °C for 5sec. D) Heated milk at 73 °C for 30sec. E) Heated milk at 73 °C for 10min. F) Heated milk at 73°C for 15min.

Figure 7.1. Confocal microscopy observations of Tina biofilm at different magnifications. Biofilm (coded in green) covers the surface almost entirely.

Figure 7.2. Bacteria colonies dispersed within the deeper wood layers. Microorganisms are coded in yellow, wood fibers appear in brown.

Figure 7.3. Detail of bacteria distribution in wood splinters of Tina. Bacteria colonies are gathered around vessels perimeter.

Figure 7.4. Biofilm population. **A)** Bacteria colony are mostly made of alive microorganisms (coded in yellow), and few dead microorganisms (coded in red). **B)** colonies made of dead (red) and alive (green) cells are enclosed from exopolysaccharides (blue). **C)** Cocci consortium. Just few dead bacteria are present, while most of the cells are showed to be alive (green).

Figure 7.5. **A)** Bacteria (green) surrounded by exopolysaccharides matrix coded in blue. **B)** Consortium, made of alive and dead bacteria, and exopolysaccharides.

Figure I CoRFiLaC. Consorzio di Ricerca Lattiero Casearia located in Ragusa

Figure II. Nikon D-Eclipse C1si. Main components.

Figure III. Comparison between Spectral data from C1si (on the left) and those from the probe manufacturer (on the right)

## *List of Abbreviations*

<b>AOBS</b>	Acousto-Optic Beam Splitter
<b>AOTF</b>	Acousto-Optical Tunable Filter
<b>BFP</b>	Blue Fluorescent Protein
<b>cDNA</b>	Complementary DNA
<b>CFP</b>	Cyan Fluorescent Protein
<b>CLSM</b>	Confocal Laser Scanning Microscope
<b>CoRFiLaC</b>	Consorzio Filiera Lettierio Casearia
<b>CPS</b>	Capsular Polysaccharides
<b>DIC</b>	Differential Interference Contrast
<b>DIP</b>	Digital Image Processing
<b>DISP</b>	Dual Integration Signal Processing
<b>DMSO</b>	Dimethyl Sulfoxide
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid
<b>EPS</b>	Exopolysaccharides
<b>FCS</b>	Fluorescence Correlation Spectroscopy
<b>FISH</b>	Fluorescence in Situ Hybridization
<b>FITC</b>	Fluorescein Isothiocyanate
<b>FLIM</b>	Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy
<b>FLIP</b>	Fluorescence Loss in Photobleaching
<b>FRAP</b>	Fluorescence Recovery After Bleaching
<b>FRET</b>	Fluorescence Resonance Energy Transfer
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>INRA</b>	Institut National de la Recherche Agronomique
<b>LAB</b>	Lactic Acid Bacteria

<b>MFGM</b>	Milk Fat Globule Membrane
<b>mRNA</b>	Messenger Ribonucleic Acid
<b>NIST</b>	National Institute of Standards and Technology
<b>NDT</b>	Non-Destructive Testing
<b>NMR</b>	Nuclear Magnetic Resonance
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction
<b>PDF</b>	Probability Density Function
<b>PDO</b>	Protected Designations of Origin
<b>PMT</b>	Photo Multiplier Tube
<b>ROI</b>	Region of Interest
<b>rRNA</b>	Ribosomal Ribonucleic Acid
<b>SEM</b>	Scanning Electron Microscope
<b>TTGE</b>	Temporal Temperature Gradient Gel Electrophoresis
<b>YFP</b>	Yellow Fluorescent Protein
<b>VOXEL</b>	Volume Element
<b>μ-CT</b>	Micro-Computed Tomography
<b>2D</b>	Two Dimensional
<b>3D</b>	Three Dimensional

## *List of Tables*

Table 5.1. Statistical data corresponding to large and small lipids.

Table 5.2 Circularity of fat particles in Pecorino cheese.

Table 5.3 Pairwise correlations in Ragusano cheese.

Table 5.4 Pairwise correlations in Pecorino Cheese.

## *Sintesi*

### **Microstruttura e microscopia confocale a scansione laser**

Negli ultimi anni, lo studio della microstruttura si è molto diffuso come mezzo per il controllo e il miglioramento della qualità degli alimenti. Molti ricercatori del settore hanno focalizzato la loro attenzione sulla relazione tra il gran numero di proprietà chimico-fisiche, attributi sensoriali e salubrità di alcuni alimenti e le relative caratteristiche nanoscopiche, microscopiche e macroscopiche. È noto che la creazione di nuovi alimenti o il miglioramento di quelli già esistenti dipende largamente da una maggiore conoscenza di queste interrelazioni. Tuttavia non è semplice monitorarle e manipolarle, in quanto gli alimenti sono spesso materiali complessi: un alimento come il formaggio, ad esempio, contiene una grande varietà di componenti (proteine, lipidi, carboidrati, acqua, minerali) i quali potrebbero formare più strutture a vari livelli (micelle, goccioline di grasso, cristalli di ghiaccio, cristalli di grasso), e che potrebbero trovarsi in condizioni ambientali diverse durante la produzione, lo stoccaggio, il trasporto e l'utilizzazione (processi termici). Dunque, si rende necessario conoscere non solo gli ingredienti base, come fossero gli elementi primari di blocchi di costruzione, ma anche le forze responsabili della loro organizzazione a livello nanoscopico, microscopico e macroscopico, per poi poter decidere di migliorare o creare un nuovo alimento.

Varie tecniche possono essere utilizzate a questo scopo: tra le più avanzate si pensi a microscopia ottica ed elettronica, microtomografia computerizzata ( $\mu$ CT), risonanza magnetica nucleare (NMR), metodi di scattering, tecniche acustiche, modellazione e simulazioni computerizzate.

Lo sviluppo di metodologie non distruttive, volte all'analisi della microstruttura dei più svariati tipi di materiale, è oggi un'esigenza fortemente sentita in molteplici settori del settore produttivo e della ricerca. Si manifesta così la necessità di avere a disposizione un'adeguata strumentazione da laboratorio, la quale consenta di effettuare tutte le analisi in maniera semplice e veloce,



contenendo i costi dell'operazione. Il microscopio confocale a scansione laser (CLSM), nell'ambito delle tecniche non distruttive, è una delle metodologie diagnostiche più all'avanguardia ed attualmente di grande interesse.

Brevettato da Marvin Minsky nel 1957, le prime applicazioni del CLSM risalgono agli anni '70, con l'avvento di computer, laser e software di *image processing*. Fu nel 1985 che il CLSM divenne facilmente utilizzabile dai ricercatori in campo biologico, con la possibilità di eliminare i piani fuori fuoco e di ricostruire immagini tridimensionali tramite sezioni ottiche non invasive. Nato esclusivamente per indagini mediche e biologiche, oggi, grazie all'avanzamento tecnologico raggiunto, il CLSM è largamente impiegato in un vasto campo di applicazioni, dalla scienza dei materiali alle scienze alimentari.

Il principio di funzionamento del confocale deriva direttamente da quello del microscopio a fluorescenza: anziché illuminare una regione estesa del campione, come nella microscopia convenzionale, soltanto un singolo punto alla volta del campione viene illuminato. Grazie alla presenza del "pinhole", la sorgente laser viene focalizzata con estrema precisione sul preparato, aumentando notevolmente la risoluzione e la profondità di campo. La dotazione di componenti ad alta precisione permettono di raggiungere la sua piena funzionalità. Il microscopio confocale può essere dotato di più laser, ognuno adatto ad una determinata frequenza d'eccitazione, la quale verrà assorbita dalle molecole fluorescenti presenti nel campione. Le immagini ottenute, particolarmente definite, possono evidenziare in vari colori diverse molecole presenti nel preparato, permettendo di apprezzarne la tridimensionalità.

La capacità di molecole o di atomi di assorbire luce ad una determinata lunghezza d'onda e conseguentemente emettere luce ad una lunghezza d'onda più lunga dopo un breve intervallo di tempo è nota come fluorescenza. Ogni molecola o atomo fluorescente può assorbire ed emettere a specifiche lunghezze d'onda. L'emissione avverrà a lunghezze d'onda più lunghe e quindi meno energetiche rispetto a quelle di assorbimento. Inoltre, ogni molecola fluorescente può ripetere il processo più volte, prima di essere "scolorita". Uno dei più comuni fluorocromi, la Fluoresceina Isotiocianato (FITC), può essere eccitata approssimativamente 30000 volte prima di perdere la fluorescenza. Per ottenere immagini di ottima qualità è sempre necessario settare di volta in volta il sistema di scansione.

Da un sufficiente numero di immagini è possibile ricostruire la struttura interna tridimensionale dell'oggetto, attraverso appositi algoritmi interni al software a corredo con lo strumento.

Spesso, l'interesse primario non risiede tanto nella visualizzazione dell'immagine scattata, quanto nella sua successiva elaborazione al fine di estrarne delle informazioni quantitative, significative per la specifica applicazione. L'importanza di un' immagine dipende dalle informazioni quantitative e dai dati numerici che possiamo estrapolare.

Il CoRFiLaC ha pensato di investire parte delle proprie risorse per l'allestimento di un laboratorio di microscopia confocale e di una stazione di *image processing* allo scopo di studiare la microstruttura dei prodotti lattiero-caseari. La postazione di microscopia confocale affianca in maniera complementare e sinergica quella già esistente di microscopia elettronica a scansione ed entrambe collaborano con il laboratorio di *image processing* per lo sviluppo di nuove tecniche di acquisizione ed elaborazione d'immagine.

Il presente lavoro di tesi illustra e riassume attività svolte sia presso il laboratorio di microscopia confocale del CoRFiLaC in stretta collaborazione con i ricercatori che vi operano, sia presso il Confocal Laboratory del Nutrition and Food Science Department, Utah State University, Utah (USA). Dalla cooperazione con l'Institut National de la Recherche Agronomique (INRA), Rennes-Francia, è stato sviluppato il progetto "*tina*".

## **Organizzazione della tesi**

Si riporta di seguito un breve riepilogo delle principali tematiche affrontate, nel corso dei prossimi capitoli, dal presente lavoro di tesi.

Il primo capitolo fornisce innanzitutto una panoramica di riferimento circa la microscopia, partendo dagli aspetti più generali e focalizzando l'attenzione sulla microscopia confocale a scansione laser.

Il secondo capitolo tratta i principi fisici della fluorescenza e dell'interazione dei fotoni con la materia, distingue fra le diverse sostanze fluorescenti ed illustra il procedimento di marcatura dei campioni. Viene descritto il procedimento di immunoistochimica ed in particolare l'uso della GFP e dei suoi derivati come marcatori.

Il capitolo terzo introduce l'argomento microstruttura e si concentra sullo studio della microstruttura alimentare al fine di migliorare o creare nuovi alimenti.

Nel capitolo quarto si affronta la trattazione dedicata all'analisi di immagine digitale (DIP) a seguito dell'ottenimento dell'immagine confocale. Il capitolo propone una visione d'insieme delle tecniche di elaborazione di immagine disponibili. Si tratteranno gli algoritmi dedicati al miglioramento dell'immagine (denoising, filtraggio, segmentazione), accanto a strumenti investigativi più complessi volti all'individuazione dei singoli elementi e alla caratterizzazione tridimensionale della microstruttura dei campioni oggetto di indagine.

Dal capitolo quinto al capitolo settimo si sviluppa la parte applicativa, vengono presentati alcuni studi sviluppati nell'ambito dell'attività svolta sia al laboratorio di microscopia confocale del CoRFiLaC sia al Confocal Laboratory della Utah State University (Utah, USA). I risultati presentati si estendono dall'acquisizione del dato all'estrapolazione dei risultati quantitativi associati.

Il primo caso di studio presentato riguarda la caratterizzazione della microstruttura di campioni di Pecorino. In particolare, le immagini bidimensionali ottenute dall'osservazione al microscopio confocale sono state sottoposte a rendering volumetrico. La rappresentazione 3D così ottenuta è stata analizzata per valutare l'organizzazione microstrutturale dei componenti proteici e lipidici e quantificare la fase grassa.

Nel secondo progetto, un campione di *Ragusano*, con struttura tipica dei formaggi a pasta filata, è stato messo a confronto con un campione di *Pecorino*, esempio dei formaggi a pasta pressata. I formaggi a pasta filata, rappresentati dal *Ragusano*, sono caratterizzati da una struttura fibrosa: le catene caseiniche e i gruppi di globuli di grasso sono organizzati in lunghi filoni, seguendo una specifica direzionalità. I formaggi a pasta pressata, rappresentati dal *Pecorino*, hanno invece una struttura spugnosa: le micelle caseiniche globulari si uniscono tra loro a formare gruppi senza uno specifico orientamento. Questo conferisce ai formaggi a pasta pressata una trama amorfa.

Il terzo studio proposto riguarda l'identificazione dei difetti legati alla produzione anomala di gas in campioni di *Cosacavaddu*. È stato proposto un algoritmo per la classificazione dei singoli oggetti delle immagini confocale. Il metodo, basato sulla probabilità statistica di localizzare i difetti ricercati, è stato sviluppato in maniera tale da essere totalmente automatico.

Nel quarto studio, è stato valutato l'effetto dei trattamenti termici sulla microstruttura del latte. I processi di sanitizzazione mirano a preservare la qualità del prodotto e a prolungare la shelf-life dello stesso. Essi tuttavia possono provocare alterazioni a livello micro strutturale, così come si evince dal progetto in questione.

Il quinto progetto, ha avuto come oggetto le “*tine*”, contenitori di legno utilizzati per la produzione dei formaggi tradizionali. Il progetto ha avuto l'obiettivo di individuare colonie di batteri lattici nel legno di “*tina*”, batteri che arricchiscono la microflora naturale del latte e che sono responsabili delle fermentazioni lattiche. Il progetto si è articolato in più fasi: in un primo momento sono state prese in esame “*tine*” attive di varie aziende locali, in un secondo momento sono state analizzate “*tine*” inattive, in disuso durante il periodo estivo.

I progetti che seguiranno si focalizzeranno sull'analisi di biofilm tramite nuovi marcatori specifici e nuove tecniche di colorazione, come l'immuisto chimica e la tecnica FISH (Fluorescence In Situ Hybridization).

FISH e sonde marcatrici dell' rRNA forniscono possibilità uniche di analizzare e determinare l'organizzazione delle colonie microbiche nel loro ambiente naturale. Con la preparazione di fluorocromi per acidi nucleici specifici di una determinata specie batterica, è possibile visualizzare la distribuzione della specie di interesse nell'ambito del biofilm analizzato. Queste tecniche permettono di marcare selettivamente anche più di una specie batterica, e si rivelano di grande importanza per la determinazione dell'architettura dei biofilm.

Infine, l'appendice è interamente dedicata al Consorzio di Ricerca Lattiero Casearia, non solo alla missione dello stesso, ma anche ai suoi laboratori e alle strumentazioni in esso presenti. Gran parte del capitolo focalizza l'attenzione sul microscopio confocale a scansione laser ed in particolare su *NIKON D-Eclipse CIsi*, lo strumento del laboratorio di microscopia confocale del CoRFiLaC.

## ***Part I: General Overview***

Cheese quality can be tested and studied either using chemical and microstructural analysis: Traditional Sicilian cheeses have different structure which is affected by factors such as milk and cheese chemical components, heat treatment of milk and curd, cheese manufacturing, rate of acid development and proteolysis, and ripening (Lucey et al., 2003). These factors control and modify the arrangement of casein micelles and the other components (Lucey et al., 2003). The result in size, shape and spatial aggregations will determine the body and their texture (firmness, softness, elasticity, crumbliness, pastiness) (Lucey et al., 2003). Thus, evaluation of microstructural features like holes, casein matrix dimension and shape, and casein fibres orientation aims to study the effects caused by variation of manufacture parameters and cheese quality control (Campo and Licitra, 2006). Microscopy allows direct visualization of cheese structure. It is a powerful tool for understanding relationships between textural properties and physico-chemical analysis, such as observing the state of fat after heating and stretching pasta filata-style cheese (Everett and Auty, 2008).

Confocal Laser Scanning Microscopy is a relatively recent non-destructive testing method which offers an attractive opportunity for the three-dimensional (3D) insight of the inner structure of many kind of samples (biological and food). Due to the great technological advances and the computational power of modern calculators, CLSM is employed for a wide range of applications in the scientific communities, whenever a correlation is required between the macroscopic behaviour of matter and its microscopic properties.

In order to structure engineered food products with the desired properties, it is essential to be able to determine and control the processes underlying structural formation. The confocal laser scanning microscope provides an important tool in this respect, allowing structural changes to be followed directly at the microscope under dynamic conditions.

The overall objective of the present dissertation is to describe how the modern CLSM can be successfully used to examine and control the microstructure of complex foods and materials. The principles and the developments of CLSM

instruments as well as techniques and evaluation method will be discussed. Examples will be given from food and material research.

Foods are complex colloidal structures. In order to obtain a full understanding of the complexity of food microstructure, a wide range of length scales needs to be taken into account. This requires a combination of techniques and information from the nano- to the micro-regime that can be obtained combining CLSM with Scanning Electron Microscopy (SEM).

This thesis has been developed at CoRFiLaC (Ragusa, Italy). Particularly, first the necessary experience on the use of confocal microscope was acquired working at the Confocal Laboratory of the Utah State University (Logan, Utah - USA). The know-how developed at the Utah State University has allowed us to better choose our machine.

CLSM of CoRFiLaC is a brand new instrument. It has the advantage to acquire images in real time spectral mode (it can collect the whole spectral range information in approximately 2sec). In other systems, this acquisition should take too much time (several minutes), making the experiment running impossible.

A very interesting image processing software, learned in USA, allowed me to reconstruct volumes from confocal two-dimensional (2D) slices and to have some statistics elaboration on that. Hereafter, a concise outline about the thesis organization will follow.

The first chapter will provide an introductive overview on microscopy, and will focus on fluorescence microscopes and CLSM. The basic setup of a CLSM station will be described and fundamental notions on the data reconstruction process will be provided.

The second chapter will give a detailed description of physical principles of fluorescence, photon production and their interaction with matter. Staining procedures and immunolabelling will be explained and it will be tackled the difference among all the available fluorophores

In the third chapter I will deal with food microstructure, microstructural features and their interactions. Then, the topic will be designing Food functionality and improving food quality through microstructural approaches.

In the fourth chapter, advanced tools aimed at digital image processing of the acquired data will be introduced. automated computer methods tailored for food

science applications will be presented. Qualitative and quantitative analysis will be examined.

The chapters from fifth to seventh are related to CLSM applications, summarized in the Part II section.

The appendix is focused on CoRFiLaC, its mission and its facilities. It will be described the microscopy laboratory, discussing the specific characteristics of CLSM and *NIKON D-Eclipse C1si*, our instrument in CoRFiLaC.

